

Handwritten signature and initials, possibly 'AP', in the top right corner.

Transfer of fluid samples

Patent Number: DE19605814

Publication date: 1997-08-21

Inventor(s): LANGE HANS (DE)

Applicant(s):: INNOVA GMBH (DE)

Requested Patent: ☐ DE19605814

Application

Number: DE19961005814 19960216

Priority Number(s): DE19961005814 19960216

IPC Classification: B01L3/02 ; G01N30/06 ; G01N33/50 ; C12Q1/68 ; G01N35/02 ; G01N1/10 ; C12Q1/70 ; G01N33/53

EC Classification: G01N30/06, B01L3/00C6D

Equivalents:

Abstract

To transfer fluid samples, the outlet openings of a reaction vessels are moved directly over the catch openings of the recipient vessels, in a flexible sliding movement. The fluids are transferred from the reaction vessels into the catch vessels (A2) and, after a simultaneous transfer of several vessels, fluids are transferred to the catch vessels in the layout.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

①9 BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND

DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫

Offenlegungsschrift

⑩

DE 196 05 814 A 1

⑤1 Int. Cl.⁸:

B 01 L 3/02

G 01 N 30/06

G 01 N 33/50

C 12 Q 1/68

G 01 N 35/02

G 01 N 1/10

// C12Q 1/70, G01N
33/53

- ②1 Aktenzeichen: 196 05 814.7
 ②2 Anmeldetag: 16. 2. 96
 ④3 Offenlegungstag: 21. 8. 97

⑦1 Anmelder:

Innova GmbH, 68307 Mannheim, DE

⑦4 Vertreter:

Bissel und Kollegen, 91052 Erlangen

⑦2 Erfinder:

Lange, Hans, 68623 Lampertheim, DE

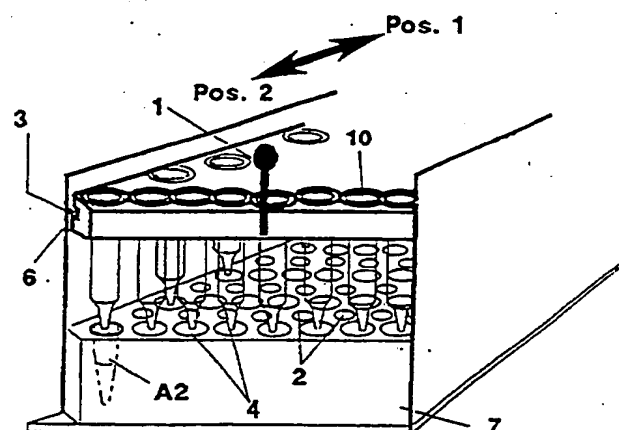
⑤6 Entgegenhaltungen:

DE	42 09 064 A1
DE	42 08 488 A1
DE	41 07 282 A1
DE	38 13 871 A1
DE	37 12 778 A1
DE	2 95 06 889 U1
DE	94 03 134 U1
US	45 54 839

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Vorrichtung und Verfahren zur Aufarbeitung einer Mehrzahl von Proben

⑤7 Es wird eine Vorrichtung und ein Verfahren beschrieben, die eine einfache Probenvorbereitung mit einer Vielzahl von Proben ermöglichen. Dabei wird Flüssigkeit aus einem Reaktionsgefäß (R0) in ein Auffanggefäß (7) geleitet und nach gleichzeitigem Positionswechsel von mehreren Gefäßen kann aus dem Reaktionsgefäß (R0) eine besondere Fraktion in eine andere Form von Auffanggefäßen (A2) überführt werden (Fig. 3). Spezielle Anwendungsgebiete sind die Probenvorbereitung für die Nukleinsäureanalytik mit Glasoberflächen und chaotropen Salzen, bei der die isolierte Nukleinsäurefraktion direkt in Auffanggefäße überführt wird, die für eine anschließende Amplifikation geeignet sind. Eine weitere Anwendung ist die Immunadsorption als Probenvorbereitung für die High Pressure Liquidflow Chromatographie.



DE 19605814 A1

DE 19605814 A1

Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung und Verfahren zum Überführen von Flüssigkeiten aus einem Reaktionsgefäß in mehrere Auffanggefäße.

Bei der Analyse von Nukleinsäuren ergibt sich folgende Problemstellung:

Da Nukleinsäuren in der Natur nicht frei zugänglich vorkommen, sondern aufgrund ihrer Funktion in der Natur erhalten bleiben müssen und deswegen in Zellkompartimenten immer gut geschützt vorliegen, ist es für ihre qualitative oder quantitative Analyse notwendig, in einer Probenvorbereitung die Zellkompartimente zu zerstören und die Nukleinsäuren freizusetzen. Dabei werden die Nukleinsäuren bei dieser Art von Probenvorbereitung gleichzeitig aufgereinigt.

Grund dafür ist, daß zur Analyse von Nukleinsäuren vor einer direkten Detektion meist eine Amplifikationsreaktion vorgeschaltet wird, bevor durch anschließende Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen, die bestimmte detektierbare Gruppen tragen, eine Detektion erfolgen kann.

Als Beispiel für eine Amplifikationsreaktion sei die Polymerasekettenreaktion genannt, die in US 4 683 195 beschrieben ist. Die in dieser Reaktion verwendeten Polymerasen können von Substanzen inhibiert werden, die in der Natur vorkommen, wie z. B. die prosthetische Gruppe von Hämoglobin (siehe Details in WO 92/08807).

Diese müssen gegebenenfalls zuvor durch eine Probenvorbereitung abgetrennt werden.

Diese Polymerasekettenreaktion erfolgt in speziellen Laborgefäßen in einem Thermocycler, beschrieben in EP-A-0 488 769 A2 oder auch EP-A-0 408 280 A2.

Wegen der besonders hohen Sensitivität der Polymerasekettenreaktion einerseits und der ubiquitären Verteilung von Nukleinsäuren in der Umwelt andererseits, spielt die Vermeidung von Kontaminationen in der Nukleinsäureanalytik eine große Rolle.

Mit zunehmender Bedeutung der Nukleinsäureanalytik in der Medizin allgemein, die inzwischen zu dem Begriff "Molekulare Medizin" geführt hat, wächst auch die Probenanzahl auf diesem Sektor.

Die Analyse von Nukleinsäuren läuft in folgenden Arbeitsschritten ab:

- a) Probenvorbereitung
- b) Amplifikation
- c) Detektion

Bei der Probenvorbereitung fällt derzeit der höchste Arbeitsaufwand an. Es werden überwiegend zwei Verfahren angewandt:

- aa) Das Ausschütteln der Proben mit einer Chloroform/Phenol-Mischung.
- ab) Das Verfahren der Adsorption von Nukleinsäuren an Glasoberflächen in Gegenwart von chaotropen Salzen, wie es in der EP-A-0 389 063 A2 beschrieben sind.

Aus Gründen der Umweltverträglichkeit sollten alle Verfahren mit Chloroform/Phenol umgehend durch Verfahren vergleichbar zu ab) ersetzt werden.

Ein weitverbreitetes Anwendungsformat für Verfahren ab) sind sogenannte "Spin-columns", wie sie prinzipiell beschrieben wurden in "Methods of Enzymology", Vol. 68, S. 170—182 von C.W. Chen et al. 1979 und in

einer speziellen Ausführungsform in der DE 40 34 036 A1. In der DE 41 39 664 A1 sind dazu folgende prinzipielle Arbeitsschritte erwähnt:

- ab1) "Zellaufschluß" oder sonstige Lyse
- ab2) "Adsorption der Nukleinsäure an einen festen Träger in Gegenwart eines Puffers mit hoher Ionenstärke"
- ab3) "Elution der Nukleinsäure mit einem Puffer geringer Ionenstärke"

Beschreibung eines typischen Protokolls für die Probenvorbereitung bei der Nukleinsäureanalytik nach Stand der Technik:

Zur Lyse von verschiedensten biologischen Materialien werden diese mit einem Puffer, der chaotrope Salze enthält (EP-A 0 389 063 A2) gemischt. Im Einzelfall muß die Reaktionsmischung erhitzt werden. Dieser Aufschluß wird üblicherweise in einem Standardlaborgefäß wie z. B. in US 4 713 219 beschrieben, durchgeführt.

Die für die anschließende Bindung der Nukleinsäuren an eine Festphase benötigten Laborgefäße sind in "Methods of Enzymology", Vol. 68, S. 181 Fig. 2 von C.W. Chen et al. 1979 prinzipiell beschrieben und wurden in verschiedensten Ausführungsformen kommerziell erhältlich gemacht.

Danach wird die Reaktionsmischung in ein spezielles Laborgefäß überführt, das mit einem Filtermaterial (Glasfaservlies o. ä.) bestückt ist. Durch Filtration oder Zentrifugation wird die Reaktionsmischung durch die poröse Festphase gedrückt, wobei die Nukleinsäuren adsorbiert und zurückgehalten werden. Anschließend wird mit verschiedenen Lösungen die Festphase gewaschen. Die anfallenden zu verworfenden Lösungsabfälle werden in einem Auffanggefäß gesammelt, wobei es sich hier um potentiell infektiöses Material handeln kann. Anschließend wird das Auffanggefäß gewechselt. Es wird dann ein Elutionspuffer auf die Festphase gegeben und durch anschließender Filtration oder Zentrifugation wird die Nukleinsäure wieder von der Festphase eluiert und in dem neuen Auffanggefäß gesammelt.

Dieser Arbeitsschritt benötigt ein hohes manuelles Geschick und birgt ein hohes Risiko zur Kontamination. Anschließend wird die Amplifikationsreaktion b) durchgeführt.

Entsprechende Vorrichtungen zur Durchführung dieser Verfahren nach ab) sind in WO 93/11218 beschrieben. Weitere spezielle Ausführungsformen als Einzelfilter ist in EP-A 0 268 946 A2 sowie US 3 608 736 beschrieben. Für einen höheren Probendurchsatz werden auch Ausführungsformen als "Kartusche" für die Filtration mit einer Unterdruckkammer in DE 41 43 394 C2, DE 41 27 276 C2 und EP 0567 602 B1 beschrieben. Unter dem Begriff "Kartusche" wird eine lineare Verknüpfung von mehreren Reaktionsgefäßen verstanden.

Weitere Verfahren im 96-Napf-Mikrotitrationsplatten-Format definiert in US 4 154 795 als "Verbund von Reaktionsgefäßen" sind beschrieben in WO 95/27561 als Teil eines Zentrifugationsprozesses und in WO 92/02303 als Teil eines Prozesses, der mit Überdruck den Flüssigkeitstransport bewerkstelligt. Unter dem Begriff "Verbund von Reaktionsgefäßen" wird dabei die Verknüpfung von Reaktionsgefäßen in einer Ebene verstanden.

Weitere relevante Methoden sind in WO 92/17261 beschrieben als Teile eines Filtrationsprozesses, wobei hier bis zu drei Mikrotitrationsplatten übereinander angeordnet sind. Weitere Filtrationsvorrichtungen sind

beschrieben in EP-A 0 359 249 A2, EP-A 0 272 043 A2 und WO 87/07954, wobei es sich jeweils bevorzugt um Automatisierung von Immunoassays handelt.

Alle dort erwähnten Kartuschen, Verbundvorrichtungen und Filteraufsätze müssen jeweils manuell nach jedem Arbeitsschritt, vor allem jedoch zwischen bestimmten Arbeitsschritten gewechselt werden, was erhebliches manuelles Geschick voraussetzt und bei ungeübter Handhabung zu Analysefehlern durch Kontamination führen kann.

Unter Kontamination ist dabei zu verstehen:

Der Eintrag von Aerosolen aus der Luft, die Nukleinsäure enthalten können. Vor allem bei der Analyse von menschlicher Nukleinsäure ist diese Gefahr erheblich, da ein Eintrag durch Humanmaterial des Laborpersonals wie Schuppen und sonstige epitheliale Zellen stattfinden kann.

Aerosoleintrag von Nukleinsäuresequenzen, die durch die Amplifikation vielfach vermehrt werden, dann in extrem hoher Konzentration in einem Reaktionsgefäß vorliegen und bei unsachgemäßer Handhabung über die Luft zu Kontaminationen in andern Reaktionsgefäßen führen können.

Der Übertrag von Nukleinsäuren aus einem Proben- oder sonstigen Reaktionsgefäß in ein nächstes Proben- oder Reaktionsgefäß z. B. während eines Pipettiervorganges ohne Pipettenspitzenwechsel, wie es bei anderen Analysesystemen auftreten kann.

Darüber hinaus sind für die Mehrfachkartuschen, die für die Filtration beschrieben sind, eine extrem hohe Aerosolbildung beim Filtrationsprozeß zu beobachten. Sie sind somit als extrem kontaminationsträchtig einzustufen.

All diese Verfahren haben außerdem den Nachteil, daß sie entweder nur jeweils für eine Probe anwendbar sind, oder daß bei Anwendung von mehreren Reaktionsgefäßen in einem Verbund, die Handhabung nicht einfach automatisierbar ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung und Verfahren zur einfachen Aufarbeitung von Proben in mehreren Laborgefäßen:

- ein Reaktionsgefäß
- verschiedene Arten von Auffanggefäßen
- eine einfache Vorrichtung zum gleichzeitigen Wechseln mehrerer Auffanggefäße

Auch Gegenstand der Erfindung sind geeignete Reaktions- und Auffanggefäße, die einerseits in einer kommerziell erhältlichen Laborzentrifuge in hoher Anzahl gleichzeitig verarbeitet werden können, andererseits nach der Probenvorbereitung dann direkt in einem kommerziell erhältlichen Thermocycler eingesetzt werden können, ohne daß die aufgereinigte Nukleinsäure noch einmal in ein neues geeignetes Gefäß pipettiert werden muß.

Ein weiterer Gegenstand ist ein Verfahren zur Sterilisation und/oder Zerstörung von Nukleinsäuren bei der anfallenden Abfalllösung als Maßnahme zur Reduktion des Kontaminationsrisikos.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist in einem erfindungsgemäßen Verfahren zur einfachen Aufarbeitung einer Mehrzahl von Proben geeignet. Als einfach wird in diesem Zusammenhang eine Durchführung bezeichnet, die neben den notwendigen Pipettierschritten im Verlauf der gesamten Probenvorbereitungsreaktion nach der Lyse lediglich eine Hebelbetätigung benötigt. Nach Beendigung der Probenvorbereitung wird dann mit ei-

nem Griff eine Vielzahl von Proben in einen Thermocycler für die anschließende Polymerasekettenreaktion transferiert.

Zusammenfassung der Abbildungen

Fig. 1 Verbundplatte mit Reaktionsgefäßen (R0),

Fig. 2 Verbundplatte mit Auffanggefäßen,

Fig. 3 System bestehend aus Verbundplatte mit Reaktionsgefäßen (R0) und Verbundplatte mit Auffanggefäßen,

Fig. 4 Exemplarische Anordnung eines Reaktionsgefäßes (R0) in den Positionen 1 und 2 über den Auffanggefäßen,

Fig. 5 Aufsicht auf eine Ausführungsform des Auffanggefäßes mit 48 Aufnahmeöffnungen (2) und 48 Aufnahmeöffnungen (4),

Fig. 6 Aufsicht auf eine Ausführungsform des Auffanggefäßes mit 96 Aufnahmeöffnungen (2) und 96 Aufnahmeöffnungen (4),

Fig. 7 Schnitt durch das Auffanggefäß von Fig. 6,

Fig. 8 Schnitt durch ein System bestehend aus Auffangkammer, separaten Auffanggefäßen (A2) und Reaktionsgefäßen (R0),

Fig. 9 Ausführungsform als Rotor (Aufsicht)

Fig. 10 Ausführungsform als Rotor im Schnitt Position 1,

Fig. 11 Ausführungsform als Rotor im Schnitt Position 2,

Fig. 12 Ausführungsform mit drei Auffanggefäßen im Schnitt.

Die erfindungsgemäßen Vorrichtung enthält einen Verbund von Reaktionsgefäßen (R0; Fig. 1), wobei unter Verbund zu verstehen ist eine Einheit, die mehrere Reaktionsgefäße fest verbunden zusammenfaßt, oder aber auch eine Vorrichtung als Maske, in die einzelne Reaktionsgefäße reversibel zusammengesteckt werden können. Das Fassungsvermögen der Reaktionsgefäße (R0) beträgt 0,01 — 100 ml, bevorzugt jedoch 0,05 — 5 ml. Die Öffnung (10) hat einen Durchmesser von 1 — 50 mm, bevorzugt jedoch 3 — 15 mm. Das Reaktionsgefäß (R0) kann auch mit einem einzelnen Schnappdeckel oder einer Reihe von verbundenen Schnappdeckeln verschlossen sein, die allerdings zum Druckausgleich mit entsprechenden Mitteln wie Ventilen oder kleinen Öffnungen versehen sein müssen. An der Auslaßöffnung des Reaktionsgefäßes kann, wie in Fig. 7 dargestellt, ein flexibler Schlauch (12) angebracht sein, der in die Auffangöffnungen (2, 4) jeweils hineinragt. Dieser Schlauch kann z. B. aus Silikon oder ähnlichen flexiblen Materialien bestehen. In weiteren Ausführungsformen sind die Auslaßöffnungen der Reaktionsgefäße (R0) als Kapillaren ausgeformt.

Der Verbund beinhaltet einen Griff (1), mit dem eine planare Verschiebung möglich ist. Die geometrische Anordnung der Reaktionsgefäße (R0) entspricht bevorzugt dem Format einer 96-Napf-Mikrotitrationsplatte. Die Außenabmaße sind wie folgt: Länge 50 — 500 mm, bevorzugt jedoch 100 — 150 mm; Breite 30 — 300 mm, bevorzugt jedoch 50 — 100 mm; Höhe 1 — 500 mm, bevorzugt jedoch 15 — 80 mm.

Unterhalb der Reaktionsgefäße (R0) befinden sich erfindungsgemäße Auffanggefäße, wie in einer speziellen Ausführungsform in Fig. 2 dargestellt. Es ist eine Verbundplatte analog der Ausführung für die Reaktionsgefäße mit einer geschlossenen Kammer (7), die in Fig. 7 und Fig. 8 im Schnitt dargestellt ist. Sie hat als Merkmale in dieser Ausführungsform zwei Aufnahmeöffnungen

(2, 4), in besonderen geometrischen Anordnungen, die in Fig. 5 und Fig. 6 in zwei speziellen Ausführungsformen in der Aufsicht dargestellt sind. Beide Aufnahmeöffnungen münden in entsprechende Auffanggefäße. Die Aufnahmeöffnungen sind bevorzugt trichterförmig ausgeformt und/oder besitzen einen größeren Durchmesser als der darüberliegende Auslaßstutzen des Reaktionsgefäßes (R0). Alle Aufnahmeöffnung (2) münden in das innere der geschlossenen Auffangkammer (7), die somit eine spezielle Form eines Auffanggefäßes (A1) darstellt. Das Volumen der geschlossenen Kammer (7) also des Auffanggefäßes (A1) beträgt 0,1–1000 ml, bevorzugt jedoch 5–100 ml. Aufnahmeöffnung (4) mündet in ein Auffanggefäß (A2). Das Volumen für dieses Auffanggefäß (A2) beträgt 0,01–20 ml, bevorzugt jedoch 0,05–1 ml. Darüber hinaus befinden sich an den Seitenwänden (5) eine einfache Führungsschiene (6) und eine Führungsnut (3) für den Verbund der Reaktionsgefäße (R0), die wie in Fig. 3 dargestellt zu einem Gesamtsystem zusammengesetzt sind. Zur exakten Positionierung kann ein entsprechender Einrastmechanismus an Führungsnut (3) und -schiene (6) angebracht sein.

Die Außenabmaße dieser speziellen Ausführungsform sind wie folgt: Länge 50–500 mm bevorzugt jedoch 100–150 mm; Breite 30–300 mm, bevorzugt jedoch 50–100 mm; Höhe 1–500 mm, bevorzugt jedoch 20–80 mm.

Fig. 4 zeigt exemplarisch an einem Reaktionsgefäß (R0) die Anordnung in Position 1 über der Aufnahmeöffnung (2). Diese Position 1 läßt sich in die Position 2 wechseln, wobei dann Reaktionsgefäß (R0) über Aufnahmeöffnung (4) und über Auffanggefäß (A2) steht.

Fig. 5 zeigt die Aufsicht auf eine Ausführungsform des Auffanggefäßes (A1) mit 48 Aufnahmeöffnungen (2) in einem Raster von 6×8 und ebenso vielen Aufnahmeöffnungen (4) im analogen Raster. Die Aufnahmeöffnungen (2) und (4) haben jeweils einen Durchmesser von 1–50 mm, bevorzugt jedoch 2–10 mm. Der Abstand zwischen gleichen Aufnahmeöffnungen in einer Reihe mit 8 Öffnungen entspricht in speziellen Ausführungsformen dem 96-Napf-Mikrotitrationsplatten-Format. Der Wechsel von Position 1 in Position 2 ist in diesem Falle durch eine Verschiebung der Verbundplatte der Reaktionsgefäße (R0) parallel zu den Längsseiten möglich. Je nach Ausführungsform wird die Verschiebung von Position 1 in Position 2 in Richtung der Längsseite der Verbundplatte wie in Fig. 4 ausgeführt oder aber in einer anderen Anordnung in einem beliebigen Winkel zur Längsseite der Verbundplatte, bevorzugt jedoch zwischen 25° und 65° .

Fig. 6 zeigt die Aufsicht auf eine Ausführungsform des Auffanggefäßes mit 96 Aufnahmeöffnungen (2) im Raster 8×12 und ebenso vielen Aufnahmeöffnungen (4) im analogen Raster. Die Aufnahmeöffnungen (2) haben einen Durchmesser von 1–50 mm, bevorzugt jedoch 3–8 mm. Die Aufnahmeöffnungen (4) haben einen Durchmesser von 1–30 mm, bevorzugt jedoch 2–5 mm.

Die Verschiebung ist in diesem Falle in einem Winkel von 45° zu den Längsseiten möglich. Dazu sind Haltezapfen an der Verbundplatte für Reaktionsgefäße (R0) angebracht die in entsprechenden Führungen (8) in der Auffangplatte stecken, wie in Abb. 6 gezeigt. Diese erfindungsgemäße Ausführung bedeutet eine dichteste Packung, d. h. eine maximale Anzahl von Proben im Format einer 96-Napf-Mikrotitrationsplatte. Darüber hinaus ermöglicht überraschenderweise nur diese Anordnung, ausgehend von einem Format einer 96-Napf-Mikrotitrationsplatte bei den Reaktionsgefäßen (R0),

wiederum Anordnungen im selben Format für die Auffanggefäße (A1) und die Auffanggefäße (A2). Die Auffanggefäße (A2) wiederum können einzeln oder in einem Verbund im Format einer 96-Napf-Mikrotitrationsplatte angeordnet sein.

Diese spezielle Ausführungsform ist dargestellt in Fig. 7 und Fig. 8 jeweils im Schnitt, wobei die Auffanggefäße (A2) so gestaltet sind, daß sie in einer speziellen Ausführungsform besonderen Anforderungen im Hinblick auf guten Wärmeaustausch durch die Wandung des Gefäßes genügen. Sie stellen ein abtrennbares Auffanggefäß (A2) dar und haben in der Auffangplatte entsprechende Aufnahmepositionen (9). Die Auffanggefäße (A2) können wiederum selbst auch in Form einer Verbundplatte ausgeführt sein.

Eine weitere Ausführungsform der Vorrichtung speziell für die Zentrifugation ist ein Festwinkelrotor, der die erfindungsgemäßen Merkmale aufweist und in Fig. 9 dargestellt ist. Er besitzt die erfindungsgemäßen Merkmale des Griiffs (1) und einem geteilten Rotor. Die Trennungslinie ist der Verschieberadius (13). Somit ist der innere Rotorteil gegen den äußeren verdrehbar, zum Beispiel über eine Führungsschiene und -nut, die mit einer Arretierung versehen ist. Das Reaktionsgefäß (R0) steht in diesem Falle neben dem Auffanggefäß. Der geteilte Rotor ist von Position 1 nach Position 2 nach Aufheben der Arretierung drehbar. Das Auffanggefäß (A2) hat eine Öffnung (11), die mit einem Schnappdeckel (15) oder ähnlichem Verschuß versehen sein kann. Die Durchmesser von Öffnung (11) ist analog der von Öffnung (10). Die Abmessungen des Rotors sind wie folgt: Durchmesser 50–1000 mm, bevorzugt jedoch 200–500 mm; Höhe 1–500 mm, bevorzugt jedoch 20–200 mm.

Fig. 12 stellt eine weitere Ausführungsform mit drei Aufnahmeöffnungen dar: zwei Auffanggefäße (A1, A3) und Aufnahmeöffnungen (2), die analog Fig. 7 in eine entsprechende Auffangkammer (7) mündet. Entsprechend ist das Reaktionsgefäß (R0) in Position 1 über dem Auffanggefäß (A1), in Position 2 über der Aufnahmeöffnung (2) und in Position 3 über dem Auffanggefäß (A3) platziert. Die Abmessungen von Auffanggefäß (A3) entsprechen denen von Auffanggefäß (A2).

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren stehen die Reaktionsgefäße (R0) zunächst in Position 1 und sind mit chemischen Agentien, in der Regel eine Festphase befüllt. Die Reaktionsgefäße können dabei verschiedenste Materialien beinhalten, zum Beispiel solche, die für die Nukleinsäureisolierung eingesetzt werden können. Durch die Öffnungen (10) werden die aufbereiteten Proben jeweils in die Reaktionsgefäße pipettiert. Zur Kontaminationsvermeidung können die Öffnungen (10) mit einem einzelnen Schnappdeckel oder einer Reihe von verbundenen Schnappdeckeln verschlossen sein.

In speziellen Beispielen wird die durchtretende Fraktion verworfen. Deshalb wird diese für alle Reaktionsgefäße (R0) in der Position 1 durch die Aufnahmeöffnungen (2) in ein und dieselbe geschlossene Auffangkammer (7) geleitet und gesammelt. Somit entspricht Auffangkammer (7) dem Auffanggefäß (A1).

In dieser Auffangkammer kann sich erfindungsgemäß ein Sterilisationsmittel befinden, das potentiell infektiöses Material deaktiviert, das zum Beispiel bei der Analyse von Human-Immundefizienz-Virus (HIV)-haltigen Proben anfällt. In anderen Fällen, bei denen z. B. keine vollständige Adsorption von Nukleinsäure stattfindet, wird eine Deaktivierung der Nukleinsäure bewirkt durch einen Abbau mittels Enzyme wie z. B. DNase

oder RNase oder andere Mittel, die in der Auffangkammer (7) vorgelegt wurden.

Zur vollständigen Entfernen der Probenflüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß kann anschließend ein Zentrifugationsschritt erfolgen. Hierbei eignet sich die erfindungsgemäße Ausführungsform im 96-Napf-Mikrotitrationsplattenformat besonders, da diese nach Breite und Länge in kommerziell erhältliche Rotoren von Laborzentrifugen (Fa. Hettich, Fa. Heräeus, Fa. Sorvall®) paßt. Die Höhe ist dabei nicht standardisiert und muß entsprechend angepaßt sein.

In speziellen Fällen erfolgt der Flüssigkeitstransport mittels Schwerkraft, Kapillarkraft oder Gasdruck. Über die Öffnung (10) kann dazu in einer speziellen Ausführung ein Druckgasanschluß erfolgen, um die Reaktionsmischung durch das Reaktorgefäß zu drücken.

In der Ablauffolge wird in der Regel mit verschiedenen Waschmedien das Reaktionsgefäß (R0) mit der Festphase gewaschen, wobei R0 in Position 1 verbleibt. Der anfallende Abfall wird durch (4) in die Auffangkammer (7) entsorgt. Die Ausführung der Auffangöffnungen (2) verhindern dabei die Streuung der austretenden Flüssigkeit z. B. durch Zentrifugation als Kontaminationsvermeidung. Zur weiteren Vermeidung von Kontamination im Sinne einer Verschleppung von Material zwischen den beiden Auffanggefäßen kann am Reaktionsgefäß (R0), wie in Fig. 7 dargestellt, dient der flexible Schlauch (12), der in die Auffangöffnungen (2, 4) jeweils hineinragt.

Anschließend wird durch Betätigung des Griffs (1) das Reaktionsgefäß (R0) von der Position 1 in die Position 2 gebracht. Dies wird in einer erfindungsgemäßen Ausführung z. B. direkt in der Zentrifuge durchgeführt, ohne daß die gesamte Vorrichtung aus dieser genommen werden muß und unterstreicht damit die Einfachheit des erfindungsgemäßen Verfahrens. Diese Griffbetätigung kann z. B. auch von einem Roboter Greifarm automatisch durchgeführt werden.

Anschließend wird ein Elutionspuffer in das Reaktionsgefäß (R0) pipettiert und durch bereits beschriebene Mittel wird nun die von der Festphase desorbierte Nukleinsäure in ein neues Auffanggefäß (A2) überführt.

Zur Erleichterung der Pipettierung generell haben Ausführungen im 96-Napf-Mikrotitrationsplatten-Format den Vorteil, daß 8- oder 12-Kanal Mehrfachpipetten wie z. B. von Fa. Eppendorf, Fa. Labsystems u.v.a. kommerziell angeboten werden, zur vereinfachten Anwendung vor allem bei Waschschritten herangezogen werden können. Auch hier kann die Pipettierung in der Zentrifuge erfolgen.

In einer speziellen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Nukleinsäureanalyse werden die im Auffanggefäß (A2) vorliegenden gereinigten Nukleinsäuren anschließend einem Amplifikationsverfahren in einem Thermocycler unterworfen. Die in Fig. 6 gezeigte Ausführungsform ermöglicht dabei ein erfindungsgemäßes Verfahren, bei dem das Auffanggefäß (A2) gleichzeitig das Reaktionsgefäß für die Amplifikation darstellt und dafür alle Eigenschaften besitzt. So können die entsprechenden Amplifikationsreagenzien zum Beispiel in das Auffanggefäß (A2) vom Hersteller bereits vorgelegt werden. In der Ausführungsform eines Verbundes von Auffanggefäß (A2) im 96-Napf-Mikrotitrationsplatten-Format können diese Reagenzien wiederum mit der Mehrfachpipette zugegeben werden. Danach können diese Gefäße direkt in kommerziell erhältliche Thermocycler (z. B. Fa. Perkin Elmer Cycler 9600, Fa. Techne u. a.) eingesetzt werden. Diese Ausführungs-

form stellt eine erhebliche Vereinfachung dar, da 96 Proben mittels erfindungsgemäßer Vorrichtung ohne weiteren Pipettierschritt aus der Probenvorbereitung in die Gefäße der Amplifikationsreaktion überführt werden können.

Eine weiteres erfindungsgemäßes Verfahren ist eine Probenvorbereitung für die High Pressure Liquidflow Chromatographie (HPLC). Hier ergibt sich vor allem im Bereich der Umweltschutzanalytik die Fragestellung der selektiven Anreicherung von Analyt oder einer Gruppe von Analyten zur Erhöhung der Sensitivität, bevor der eigentliche Nachweis mit der Originalmethode dann erfolgen kann. Eine besonders effektive Methode ist dafür eine Immunadsorption mit einer Festphase, die Antikörper oder eine Mischung von Antikörpern auf der Oberfläche trägt. Da auch hier die Aufgabenstellung ist, eine Vielzahl von Proben möglichst schnell und einfach aufzuarbeiten, läßt sich die hier beschriebene Vorrichtung auch mit Vorteil einsetzen:

Das Reaktionsgefäß (R0) ist dann z. B. mit dem Immunadsorber befüllt, die Probe wird aufgetragen und über den Immunadsorber geführt. In Position 1 kann dann das Eluat mit einem Auffanggefäß (A1) gesammelt werden.

Das Sammeln dieser Fraktion in einem separaten Auffanggefäß kann in speziellen Beispielen dazu benutzt werden, Substanzen, die beim HPLC-Verfahren stören, über Immunadsorption abzutrennen und die in diesem Schritt anfallende Fraktion weiterzuverarbeiten.

Nach erfindungsgemäßem Wechsel zu Auffanggefäß (A2) kann der unspezifisch gebundene Anteil durch einen speziellen Waschpuffer abgewaschen und verworfen werden. In diesem Falle wird dann durch einen weiteren, zweiten Wechsel zu einem dritten Auffanggefäß (A3) in der Position 3 ein weiteres Eluat erhalten, in dem der spezielle Elutionspuffer für den Immunadsorber appliziert wird. Durch Sammeln in einem separaten Auffanggefäß (A3) kann ein entsprechendes Weiterverarbeiten einfach ermöglicht werden.

Dabei können die Ausführungsformen von Auffanggefäß (A1) und (A3) (Fig. 12) unterschiedlich sein und den Erfordernissen der anschließenden Weiterverarbeitung angepaßt werden.

45 Bezugszeichenliste

R0 Reaktorgefäß

A1 Auffanggefäß Ausführungsform A1

A2 Auffanggefäß Ausführungsform A2

A3 Auffanggefäß Ausführungsform A3

1 Griff

2 Auffangöffnung für Auffanggefäß (A1)

3 Führungsnut für Aufnahme von Führungsschiene

4 Auffangöffnung für Auffanggefäß (A2)

5 Seitenwand

6 Führungsschiene für Verbundplatte mit Reaktionsgefäßen (R0)

7 Auffangkammer als Auffanggefäß (A1)

8 Führungen für Haltezapfen

9 Aufnahmepositionen in der Verbundplatte mit Auffanggefäßen für separate Auffanggefäße (A2)

10 Öffnung zum Beschicken des Reaktionsgefäßes (R0)

11 Öffnung zum Entnehmen des Eluates aus Auffanggefäß (A2)

12 flexibler Schlauch

13 Verschieberadius

14 Rotorachse

15 Schnappdeckel

Aufarbeitung einer Plasmaprobe zum Nachweis von Hepatitis C Virus mit einem erfindungsgemäßen Verfahren

Alle Reagenzien sind aus dem QIAamp™ Blood Kit (Kat.Nr. 29104) der Firma Qiagen, Hilden entnommen. Dazu wurde das Glasfaservlies aus dem QIAamp spin column in das Reaktionsgefäß (R0) so eingesetzt, daß es am unteren Auslaß positioniert war. Das Volumen des Reaktionsgefäßes war 2 ml. Es wurden 200 µl Plasma laut beiliegender Arbeitsanweisung verarbeitet. Die Ausführungsform der Vorrichtung entsprach Fig. 5. Das Reaktionsgefäß (R0) war mit einem Silikonschlauch (Länge 5 mm) versehen. Die Zentrifugationen erfolgten in einer Zentrifuge RC-26 der Fa. Sorvall® mit einem SH-3000 Superspeed Rotor, der die erfindungsgemäße Vorrichtung aufnehmen kann. Der Wechsel von Auffanggefäß (A1) auf (A2) erfolgte durch eine Verschiebung um 0,9 cm mittels Betätigung des Griffs (1) in der Zentrifuge.

Zur Dekontamination wurde im Auffanggefäß (A1) eine Mischung von DNase (Boehringer Mannheim Kat. Nr.: 104 132; 100 U) und RNase (Boehringer Mannheim Kat. Nr.: 109 126; 1 mg) vorgelegt. Das Auffanggefäß (A2) war in Form einer Kartusche mit jeweils 8 Auffanggefäßen in einem Streifen ausgeführt. 6 solcher Streifen konnte das Auffanggefäß (A1) in entsprechenden Aufnahmepositionen aufnehmen. Das Volumen eines einzelnen Auffanggefäßes (A2) war 250 µl, die Wände waren mit 0,2 mm extrem dünnwandig ausgelegt und die Gesamtform war so angepaßt, daß nach Verdeckeln eine Applikation in einem Thermocycler der Fa. Perkin Elmer Typ 9600 für das Amplifikationsverfahren möglich war.

Aus der Probenvorbereitung wurden ca. 50 µl Nukleinsäure gewonnen, die mit 100 µl des entsprechenden PCR-Mixes zur Amplifikation von HCV (Fa. Hoffmann La Roche HCV-Amplicore®-Kit) versetzt wurden. Ein entsprechender Nachweis von HCV-Genom mit den Reagenzien des o.g. Reagenziensatzes erfolgte laut Anweisung.

Beispiel 2

Aufarbeitung einer Wasserprobe zum Nachweis von Atrazin in einem erfindungsgemäßen Verfahren

Dieses Beispiel wurde in einer Vorrichtung analog Beispiel 1 durchgeführt. Das Volumen der Reaktionsgefäße war diesmal 20 ml. Sie waren nach dem Verfahren von Fuchs, S. Sela M. (1 973) in "Handbook of Experimental Immunology", Vol. 1, 2nd Edition, 11.1 – 11.4, Editor: Weir, D.M., Oxford, Blackwell Scientific mit einem Immunadsorber (5 ml) befüllt. Der Immunadsorber wurde hergestellt nach dem oben erwähnten Verfahren mit einem Antikörper der Fa. Cortex Biochem gegen Atrazin (Kat. Nr. CR 7090; San Leandro; California, USA).

Nach Auftragen von 12 ml Wasserprobe wurde in Position 1 mit 25 ml Puffer laut oben zitierter Vorschrift gewaschen und anschließend 2 ml Elutionspuffer (4 M Magnesiumchloridlösung) in den Immunadsorber einziehen lassen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Überführung der Flüssigkeit erfolgte bisher durch Schwerkraft. Nach Wechsel wie in Beispiel 1 von Position 1 zu 2 wurde die Vorrichtung in die Zentrifuge

(Beispiel 1) gestellt und das Eluat in das Auffanggefäß (A2) überführt. Die Auffanggefäße (A2) waren diesmal so ausgeführt, daß sie mit dem HPLC System der Fa. Hewlett Packard kompatibel waren. In diesem System wurde dann auch der Atrazin Nachweis laut Firmenvorschrift durchgeführt.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Überführen von Flüssigkeiten bestehend aus

- einer Mehrzahl von Reaktionsgefäßen mit Auslaßöffnungen
- einer Mehrzahl von Auffanggefäßen mit Auffangöffnungen,

dadurch gekennzeichnet, daß die Auslaßöffnungen der Reaktionsgefäße direkt über den Auffangöffnungen der Auffanggefäße flexibel verschiebbar angeordnet sind.

2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Auslaßöffnungen der Reaktionsgefäße direkt neben den Auffangöffnungen der Auffanggefäße flexibel verschiebbar angeordnet sind.

3. Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Auffanggefäße in verschiedenen Ausführungsformen (A1, A2 ... An) vorliegen.

4. Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß Reaktions- und Auffanggefäße in einem Verbund angeordnet sind.

5. Vorrichtung gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Verbund von Reaktionsgefäßen über einem Verbund von Auffanggefäßen einer Ausführungsform (A1) und einem Verbund von Auffanggefäßen einer Ausführungsform (A2) angeordnet sind.

6. Vorrichtung gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Verbund von Reaktions- und Auffanggefäßen jeweils in einem 96-Napf-Mikrotitrationsplatten-Format im Raster 8 × 12 vorliegt.

7. Vorrichtung gemäß Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Anzahl der Ausführungsformen für Auffanggefäße drei ist.

8. Vorrichtung gemäß Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsgefäße ein Volumen von 0,01 bis 100 ml, bevorzugt 0,05 bis 5 ml haben.

9. Vorrichtung gemäß Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Auffanggefäße ein Volumen von 0,01 bis 20 ml, bevorzugt 0,05 bis 1 ml haben.

10. Vorrichtung gemäß Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsgefäß am unteren Ende in einen flexiblen Schlauch mündet.

11. Vorrichtung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der flexible Schlauch in die Auffanggefäße (A1 ... n) hineinragt.

12. Vorrichtung gemäß Anspruch 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Einlaßöffnungen in einem Auffanggefäß in einen gemeinsamen Flüssigkeitsbehälter münden mit einem Volumen von 0,1 bis 1000 ml, bevorzugt jedoch 5 bis 100 ml.

13. Vorrichtung gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Flüssigkeitsbehälter ein Volumen von 0,1 bis 1000 ml, bevorzugt jedoch 5 bis 100 ml hat.

14. Vorrichtung gemäß Anspruch 12, dadurch ge-

- kennzeichnet, daß der gemeinsame Flüssigkeitsbehälter mit einer chemisch-reaktiven Substanz vorbefüllt ist.
15. Vorrichtung gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der gemeinsame Flüssigkeitsbehälter mit einer Dekontaminationsflüssigkeit vorbefüllt ist.
16. Vorrichtung gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der gemeinsame Flüssigkeitsbehälter mit einer Sterilisationsflüssigkeit vorbefüllt ist.
17. Vorrichtung gemäß Anspruch 1 2, dadurch gekennzeichnet, daß der gemeinsame Flüssigkeitsbehälter mit einer Substanz vorbefüllt ist, die Nukleinsäuren inaktiviert.
18. Vorrichtung gemäß Anspruch 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Auffanggefäße dünnwandig und wärmedurchlässig ausgeführt sind.
19. Vorrichtung gemäß Anspruch 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsgefäße und die Auffanggefäße (A1 ... An) überwiegend aus thermisch verformbaren Kunststoff sind.
20. Verfahren zum Überführen von Flüssigkeiten bestehend aus
- einer Mehrzahl von Reaktionsgefäßen
 - einer Mehrzahl von Auffanggefäßen in den Ausführungsformen (A1, A2 ... An), dadurch gekennzeichnet, daß Flüssigkeiten aus den Reaktionsgefäßen in Auffanggefäße der Ausführungsform (An) und nach einem gleichzeitigen Wechsel von mehreren Gefäßen Flüssigkeiten aus den Reaktionsgefäßen in Auffanggefäße der Ausführungsform (An + 1) überführt werden können.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Wechsel von Auffanggefäßen (A (n-1)) zu Auffanggefäßen (An) durch eine planare Verschiebung des Reaktionsgefäßes erfolgt.
22. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Wechsel von Auffanggefäßen (A (n-1)) zu Auffanggefäßen (An) durch eine planare Verschiebung der Auffanggefäße erfolgt.
23. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die planare Verschiebung eine Gerade in einer Ebene beschreibt.
24. Verfahren gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Länge der planaren Verschiebung höchstens 1 bis 200 mm, bevorzugt jedoch 1 bis 10 mm beträgt.
25. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die planare Verschiebung eine Kreisform in einer Ebene beschreibt.
26. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die planare Verschiebung eine nicht kreisförmige Kurvenform in einer Ebene beschreibt.
27. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Verbund einer Art von Auffanggefäßen (A1) derart in einen weiteren Verbund mit Auffanggefäßen (A2) integriert ist, daß nach der Überführung der Flüssigkeiten der Verbund mit den Auffanggefäßen (A2) vom Verbund mit den Auffanggefäßen (A1) getrennt werden und für weitere Reaktionen eingesetzt werden kann.
28. Verfahren gemäß Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Form der Auffanggefäße (A2) so ausgeführt ist, daß sie den Erfordernissen einer anschließenden Reaktion genügen.
29. Verfahren gemäß Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die anschließende Reaktion eine alternierende Temperierung des Auffanggutes im Bereich von 20–120°C, bevorzugt jedoch 50–100°C darstellt.
30. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Überführen der Flüssigkeit mittels Zentrifugalkraft erfolgt.
31. Verfahren gemäß Ansprüche 20 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Überführen der Flüssigkeit mittels Kapillarkraft erfolgt.
32. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Überführen der Flüssigkeit mittels Schwerkraft erfolgt.
33. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Überführen der Flüssigkeit mittels Gasdruck erfolgt.
34. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Überführen der Flüssigkeit mittels einer Kraft erfolgt, die nicht den Ansprüchen 30 bis 32 entsprechen.
35. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Überführen der Flüssigkeit mittels einer Kombination von Kräften aus den Ansprüchen 30 bis 34 erfolgt.
36. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsgefäße und die Auffanggefäße (A1 ... An) in einer Zentrifuge benutzt werden können.
37. Verfahren gemäß Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß die Verschiebung manuell durchgeführt werden kann, ohne daß Reaktionsgefäße und Auffanggefäße aus der Zentrifuge entfernt werden müssen.
38. Verfahren gemäß Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Verschiebung automatisch in der Zentrifuge durchgeführt werden kann.
39. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß im Reaktionsgefäß eine Adsorptionsreaktion an einer Festphase durchgeführt wird.
40. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß im Reaktionsgefäß eine Filtration mit einem entsprechenden Filtereinsatz durchgeführt wird.
41. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß im Reaktionsgefäß eine Adsorptionsreaktion von Nukleinsäuren an einer Festphase mit glasartiger Oberfläche durchgeführt wird.
42. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 41 zum Einsatz bei der Probenvorbereitung für die Analyse von Nukleinsäuren.
43. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 41 zum Einsatz bei der Probenvorbereitung für die Analyse von Nukleinsäuren, wobei zur Isolierung von Nukleinsäuren im Reaktionsgefäß (R0) eine Trennung von der Nukleinsäurenfraktion und überwiegend Nicht-Nukleinsäurenfraktion stattfindet und im Auffanggefäß (A1) die Nicht-Nukleinsäurenfraktion und im Auffanggefäß (A2) die Nukleinsäurefraktion aufgefangen wird.
44. Verfahren gemäß Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß mit den Nukleinsäuren in Auffanggefäß (A2) direkt eine Polymerasekettenreaktion in einem Thermocycler durchgeführt wird.
45. Verfahren gemäß Anspruch 20 bis 40 zum Ein-

satz bei der Probenvorbereitung für HPLC-Verfahren.

46. Verwendung von Vorrichtung und Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 45 als Bestandteil eines analytischen Reagenziensatzes.

5

47. Verwendung von Vorrichtung und Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 45 als Bestandteil eines Analysesystems.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

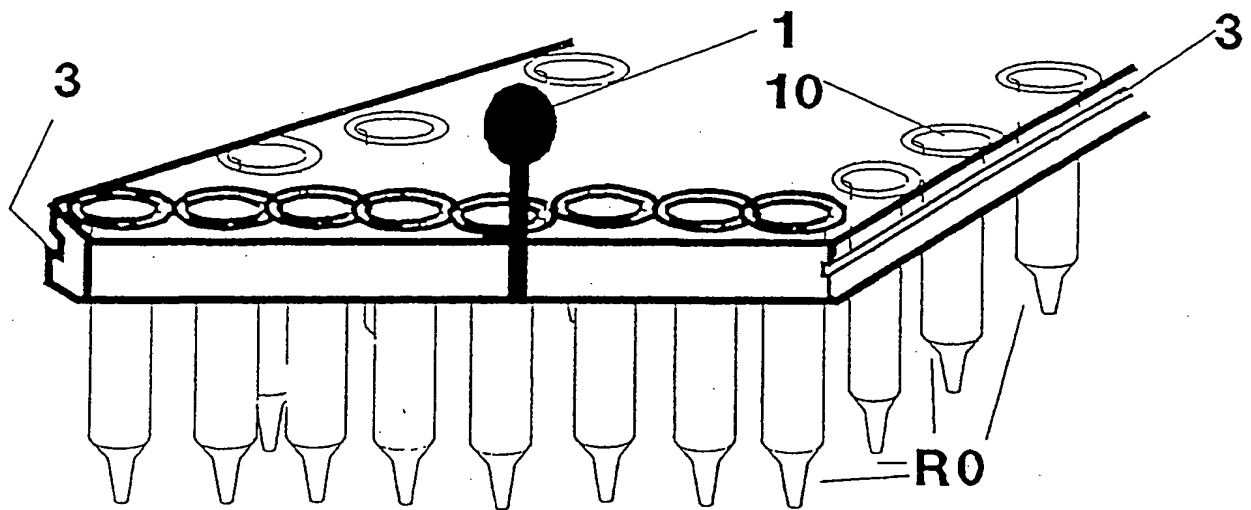


Fig 1

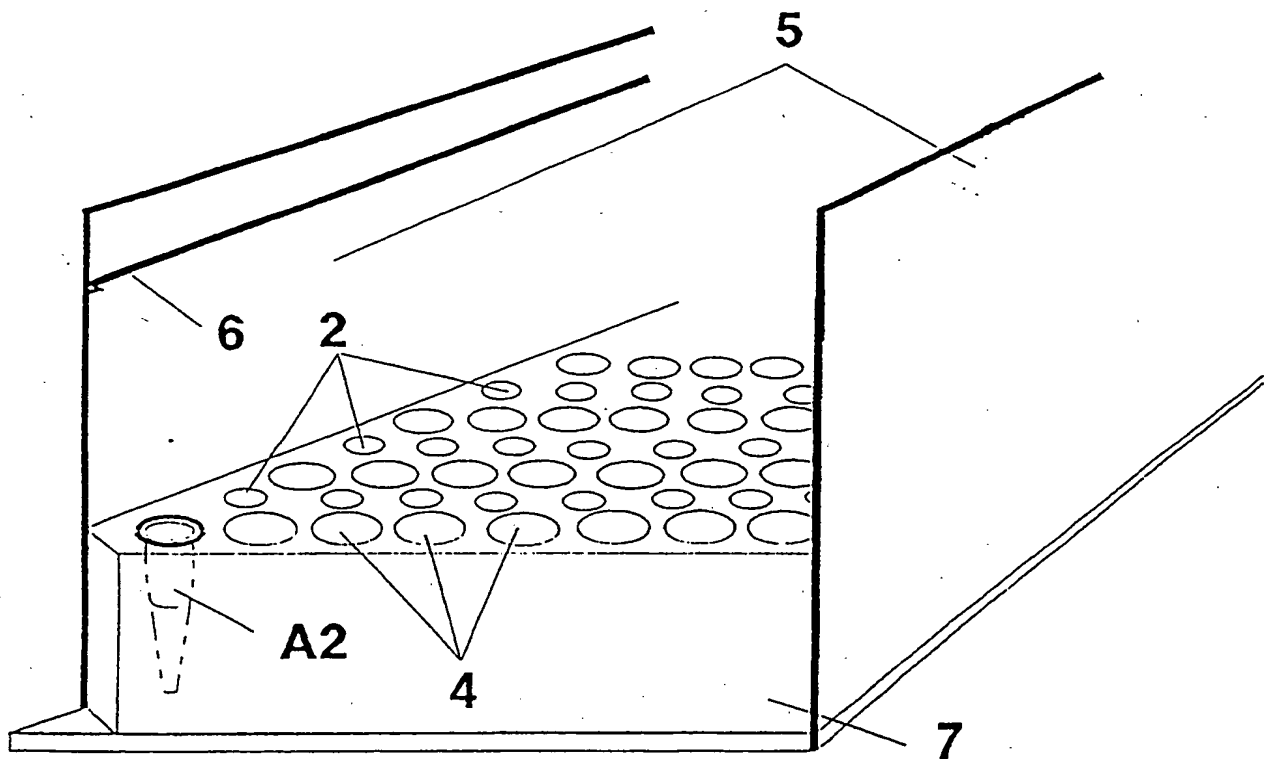
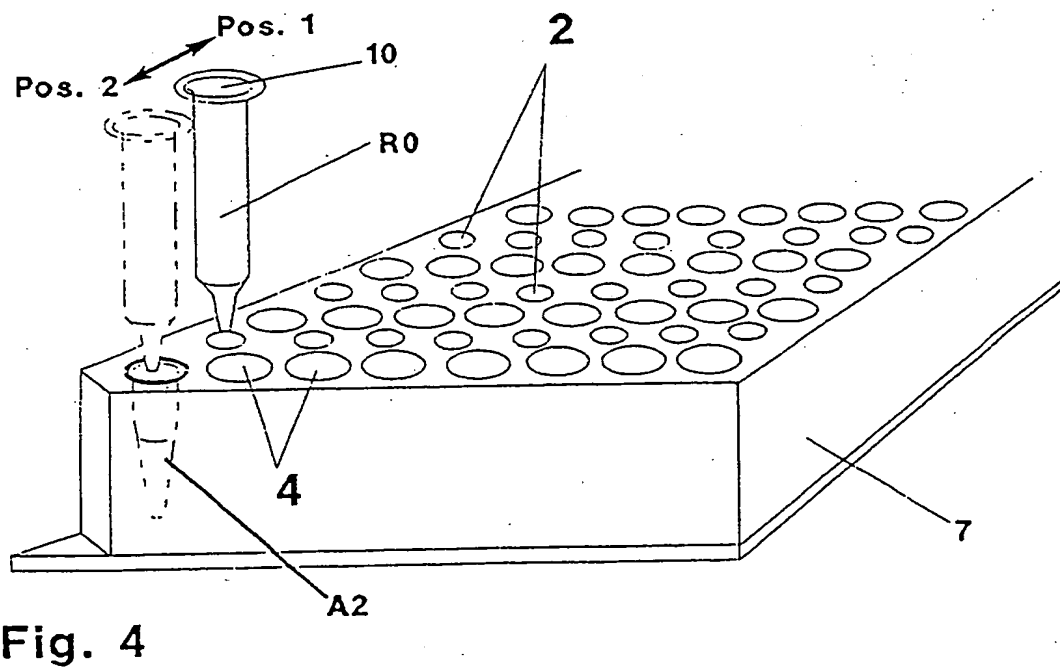
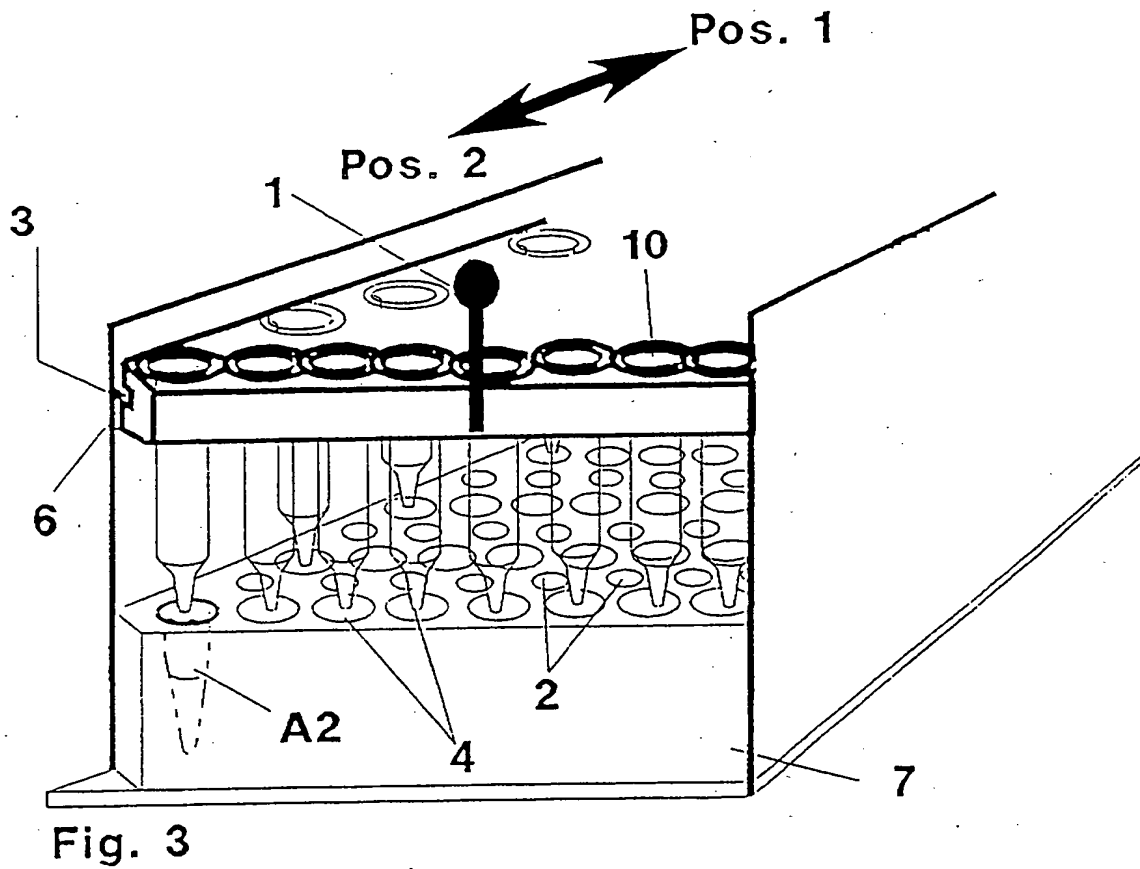


Fig. 2



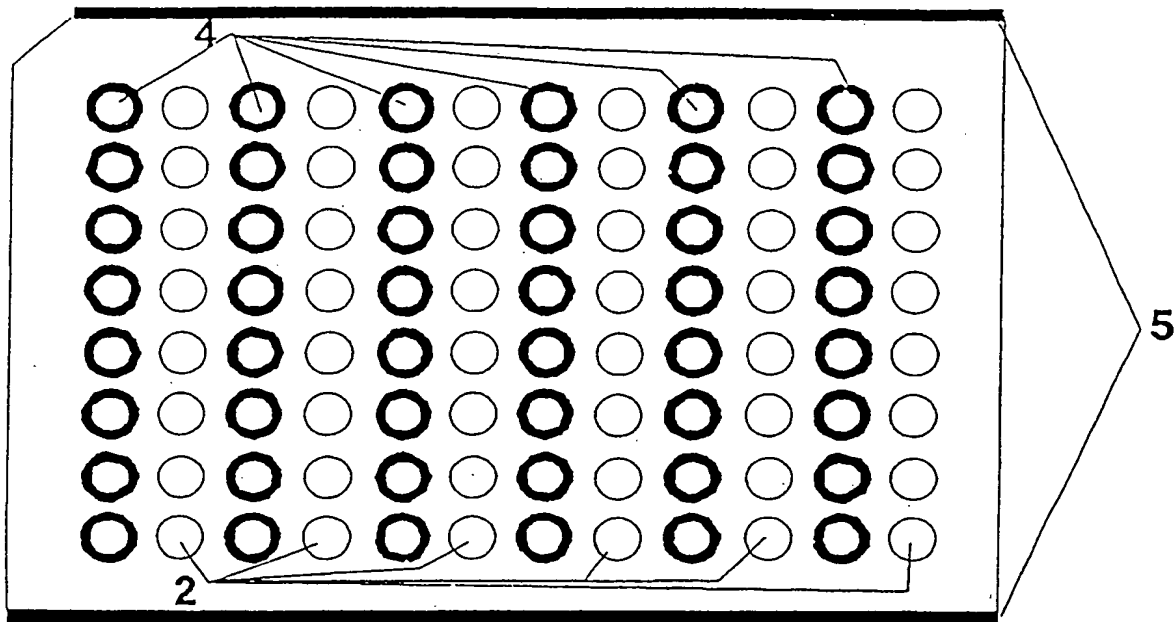


Fig. 5

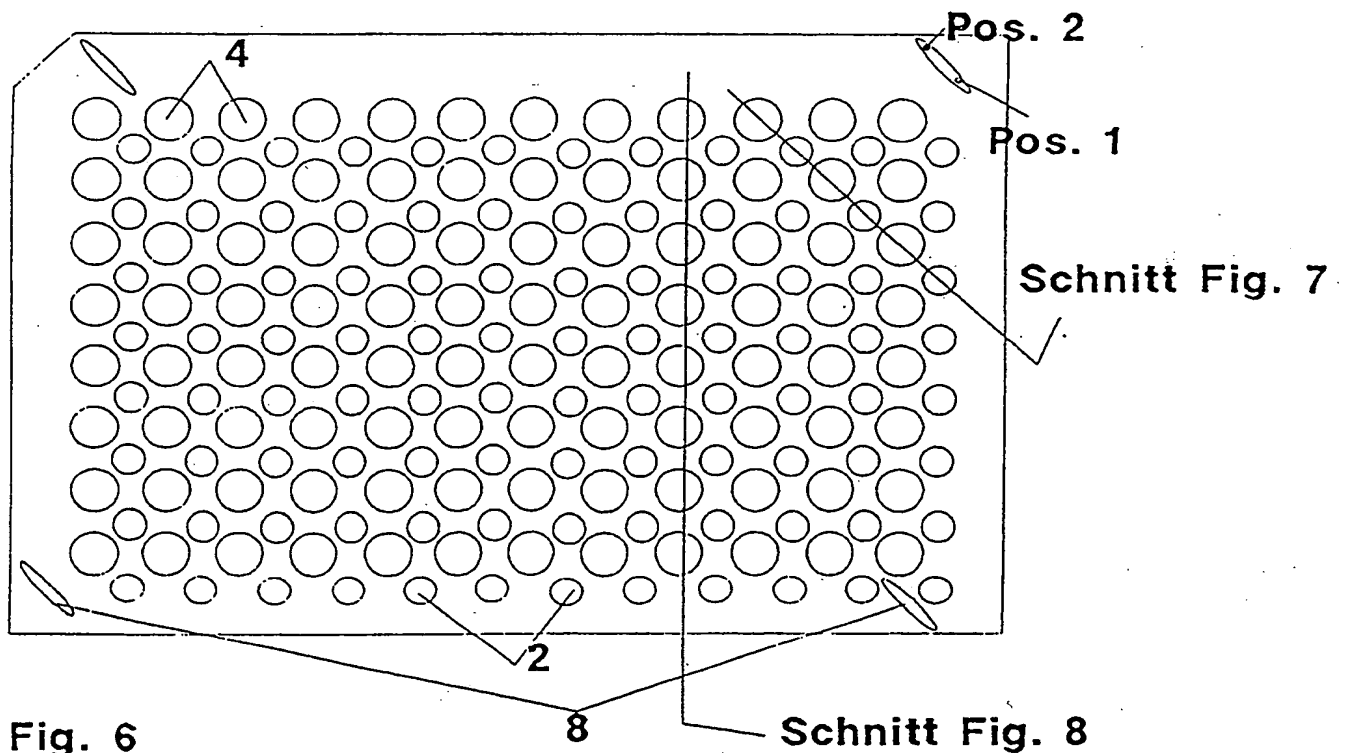


Fig. 6

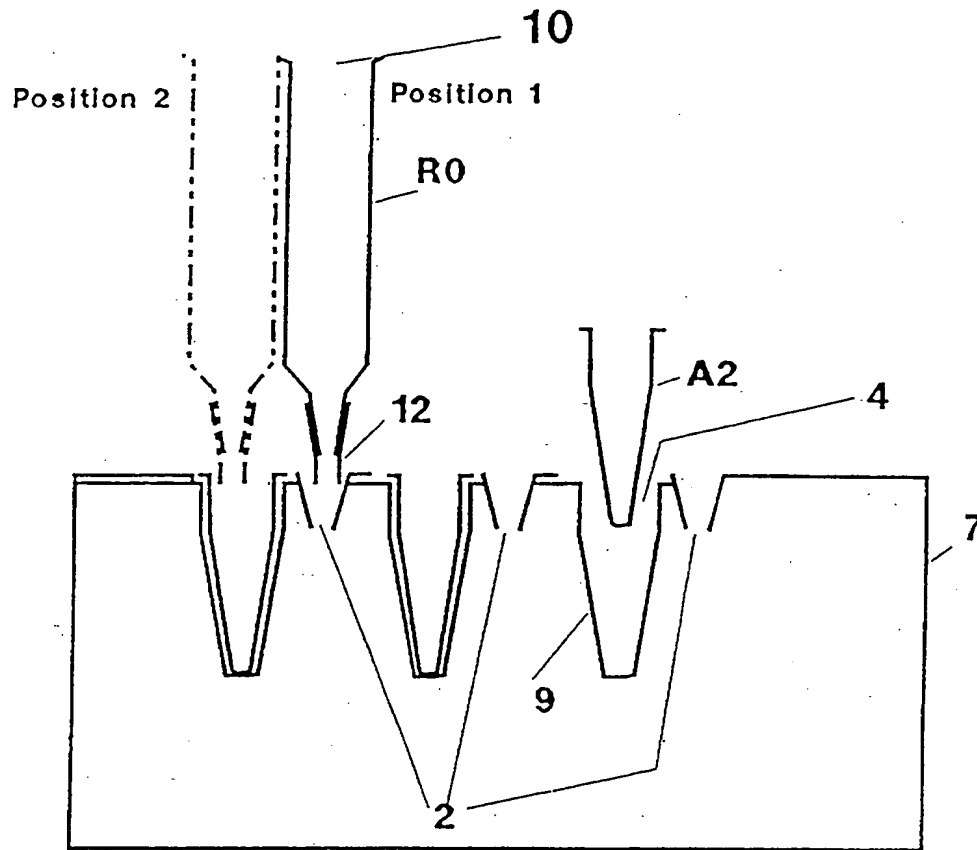


Fig. 7

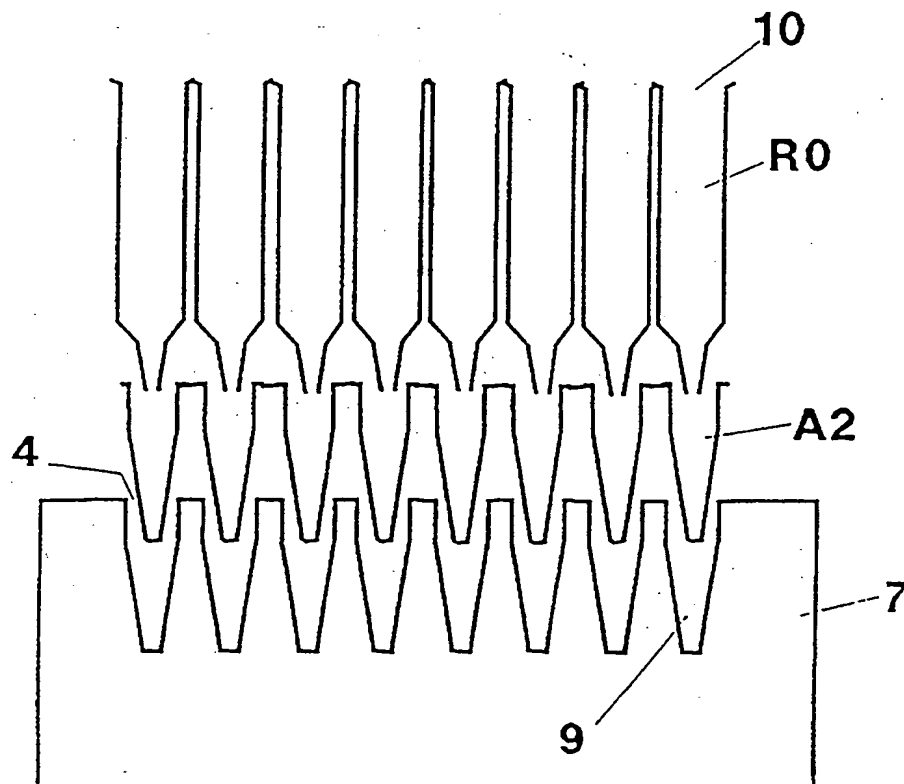
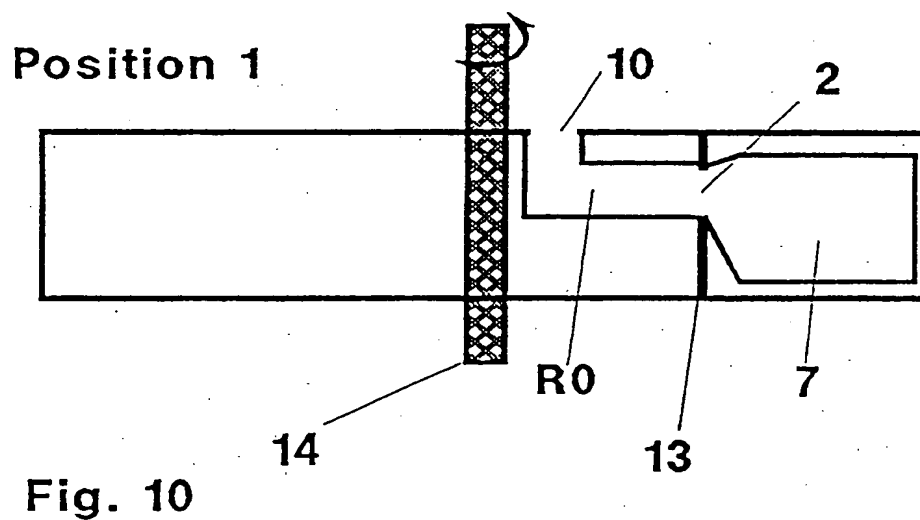
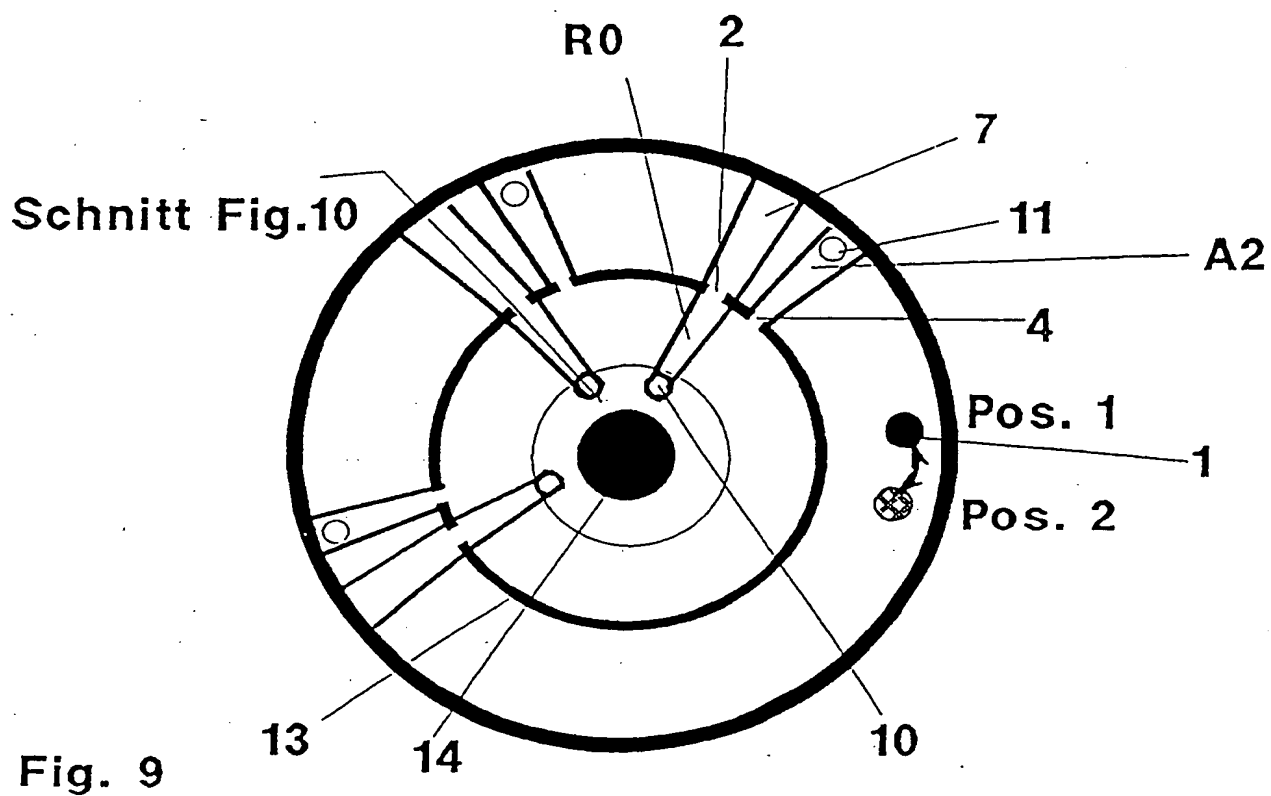


Fig. 8



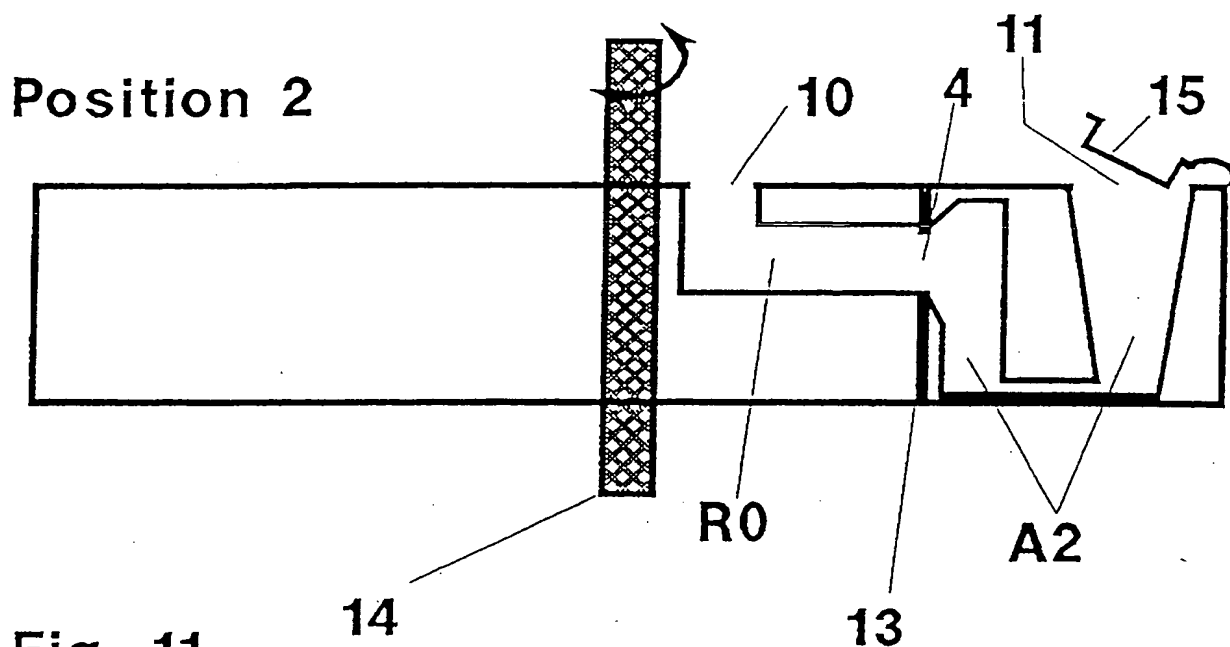


Fig. 11

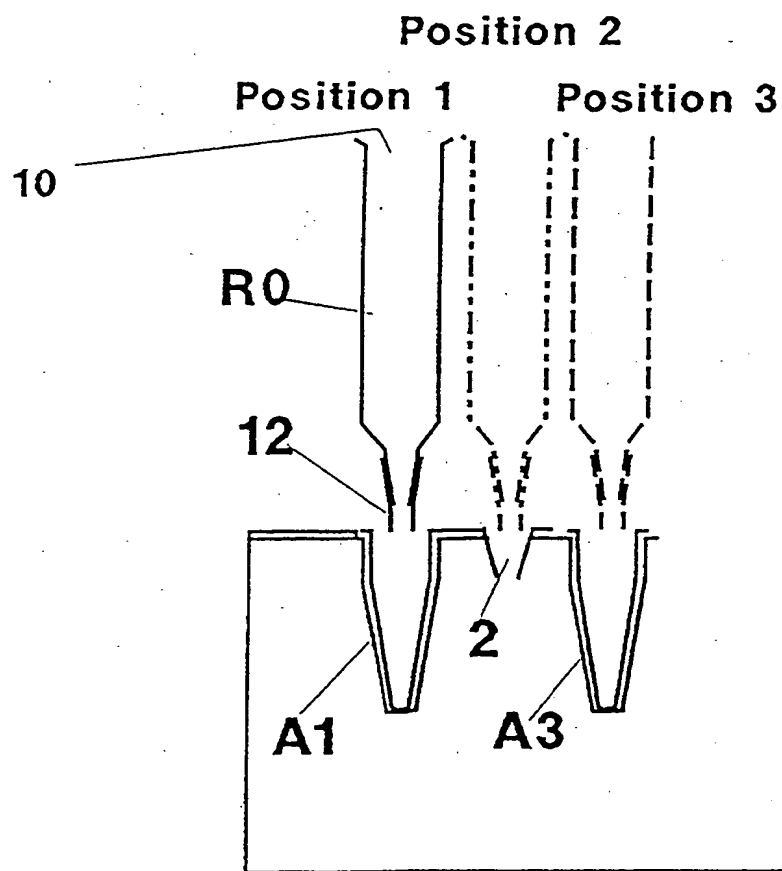


Fig. 12